

JACEK KURZEPA

*Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej
Akademia Medyczna w Lublinie
Chodźki 1, 20-093 Lublin
E-mail: kurzepa@yahoo.com*

TAJEMNICE UDARU MÓZGU: ROLA WAPNIA I MAGNEZU W ŚMIERCI NEURONÓW STREFY PÓŁCIENIA

Udar mózgu, po chorobach krążenia oraz nowotworach, zajmuje niechlubne, trzecie miejsce jako przyczyna zgonów w krajach uprzemysłowionych. Jego przyczyną jest nagły spadek przepływu krwi przez określony obszar mózgowia spowodowany najczęściej zamknięciem jednej z tętnic mózgowych (udar niedokrwienny) przez materiał zatorowy (pęknięta blaszka miażdżycowa, skrzeplina powstała w sercu). W udarach krwotocznych, potocznie zwanych "wylewami", dochodzi do przerwania ciągłości ściany tętnicy mózgowej oraz wynaczynienia krwi do przestrzeni międzykomórkowej. W obu przypadkach krew nie dociera do miejsca swojego przeznaczenia i przestaje zaopatrywać w glukozę i tlen określony obszar mózgu. Stosunkowo rzadkim rodzajem udaru krwotocznego jest krwawienie podpajęczynówkowe, w którym krew dostaje się do przestrzeni podpajęczynówkowej (fizjologicznie wypełnionej przez płyn mózgowo-rdzeniowy).

Nagłe zmniejszenie przepływu krwi doprowadza do upośledzenia funkcji, a następnie do śmierci neuronów położonych w strefie niedokrwienia. Zjawisku temu towarzyszą objawy kliniczne takie jak zaburzenia czucia, niedowład, dysfagia lub zaburzenia widzenia, których utrzymywanie się powyżej jednej doby jest warunkiem rozpoznania udaru mózgu. Jeżeli objawy kliniczne ustąpią w ciągu 24 godzin będziemy mieli do czynienia z przejściowym niedokrwieniem mózgu, nazywanym też „małym udarem”. Dokładne poznanie etiologii oraz przemian biochemicznych stojących u podłoża śmierci

komórek mózgowych może przyczynić się do wdrożenia odpowiedniego postępowania zarówno prewencyjnego, jak i terapeutycznego w udarze mózgu. Czy makroelementy: wapń oraz magnez mają wpływ i mogą zmienić bieg procesów zachodzących w komórkach nerwowych poddanych ekstremalnym warunkom panującym w obrębie niedokrwionej części mózgu?

Mózg dorosłego człowieka wymaga ciągłego zaopatrzenia w substancje odżywcze (głównie glukozę, ale też ciała ketonowe lub aminokwasy rozgałęzione) oraz tlen (około 72 l/dobę). Zaburzenia funkcjonowania neuronów pojawiają się po kilku minutach od momentu zmniejszenia dopływu krwi, a zmiana metabolizmu komórkowego zauważalna jest już po około 30 sek. Po 5 min deficyt tlenu jest w stanie zainicjować kaskadę procesów doprowadzającą do nieodwracalnego uszkodzenia komórek nerwowych (WARLOW i współaut. 2003). Niedotleniona tkanka nerwowa, w dość krótkim czasie od zaistnienia niedokrwienia, zaczyna dzielić się na strefy różniące się przepływem krwi (wyrażonym przepływem w ml/100g tkanki/min) (CASTILLO i RODRIGUEZ 2004). Najciężej dotknięta strefa, w której przepływ krwi spada poniżej 10 ml/100g tkanki/min, położona jest wewnątrz ogniska niedokrwiennego. Komórki w tym obszarze bardzo szybko obumierają z powodu braku wystarczającej ilości ATP (adenozynotrifosforanu). Obwodowo od centrum ogniska znajduje się strefa penumbry, w której przepływ krwi powyżej 10 ml/100g/min daje komórkom szansę na przeżycie. Łacińskie

słowo *penumbra* oznacza „półcień” (por. łac. *umbra* – cień). W obrębie penumbry czynność neuronów jest zaburzona, ale potencjalnie możliwa do przywrócenia. Obumierające neurony są źródłem niekontrolowanego procesu uwalniania wewnątrzkomórkowych zapasów pobudzającego neuroprzekaźnika – kwasu glutaminowego. Nadmierne pobudzenie przez glutaminian receptorów NMDA (N-metylo-D-asparginianowe) znajdujących się na sąsiednich komórkach oraz otwarcie

kanałów jonowych odpowiada za zjawisko ekscytotoksyczności, które doprowadza do zainicjowania kontrolowanej śmierci komórki (apoptozy). Proces ten może mieć dwojaki początek: z jednej strony pobudzenie tzw. receptora śmierci (Fas) powoduje aktywację „zewnątrzpochodnego” szlaku apoptozy, z drugiej strony obecność podwyższonego wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} może zainicjować „wewnątrzpochodną” drogę programowanej śmierci komórki.

WAPŃ JAKO INICJATOR KONTROLOWANEJ ŚMIERCI KOMÓRKI

W wyniku pobudzenia receptora NMDA do uszkodzonych komórek wnikają Na^+ oraz Ca^{2+} . Wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie komórek oraz wnikanie ich do mitochondriów jest jednym z czynników inicjujących przemieszczanie cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy. W jednej z hipotez dotyczących mechanizmu uwalniania cytochromu c istotną rolę odgrywa tzw. por przejściowej przepuszczalności (ang. permeability transient pore, PTP), przez który do środka mitochondriów dostają się razem z wodą związki osmotycznie czynne (MARZO i współaut. 1998). Wzrost ciśnienia osmotycznego wewnątrz mitochondrium doprowadza w efekcie do obrzęku macierzy, przerwania ciągłości zewnętrznej błony mitochondrialnej oraz uwolnienie do cytoplazmy szeregu białek, w tym również cytochromu c. PTP jest strukturą zlokalizowaną na granicy zewnętrznej oraz wewnętrznej błony mitochondrialnej. Proapoptotyczne właściwości przypisywane są również cząsteczkom białka Bax, należącego do rodziny Bcl-2, które wraz z białkiem ANT (ang. adenine nucleotide translocator) może wywoływać otwarcie PTP. Ponadto homooligomer zbudowany z białek Bax jest zdolny do wytworzenia kanału w błonie mitochondrialnej, którego średnica jest wystarczająca do przetransportowania do cytoplazmy cytochromu c (RUPNIEWSKA i BOJARSKA-JUNAK 2004). Ucieczka cytochromu c jest niezbędna do utworzenia tzw. apoptosomu, cytoplazmatycznego kompleksu, w którego skład wchodzi m.in.: Apaf-1, cytochrom c oraz prokaspaza 9, która po aktywacji do kaspazy 9 stanie się jednym z głównych „egzekutorów” apoptozy. Cytochrom c obecny w cytoplazmie ma możliwość łączenia się z receptorem dla inozytolotrójfosforanu (rIP3) zlokalizowanym na siateczce śródplazmatycznej. Efektem połączenia cytochromu c z rIP3

jest uwolnienie do cytoplazmy wewnątrzkomórkowych rezerwuarów jonów Ca^{2+} , otwarcie kanałów mitochondrialnych oraz dalszy wzrost stężenia cytochromu c w cytoplazmie (MATSON i CHAN 2003). Gwałtowny wzrost stężenia wapnia w cytoplazmie wydaje się być bardzo ważnym procesem w kontrolowanej śmierci komórki. Pozbawienie komórek receptorów dla IP3 w znacznym stopniu zmniejsza ich podatność na apoptozę.

W prawidłowo funkcjonujących neuronach procesy te są precyzyjnie regulowane homeostazą pro- i antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 (ROŻYŃKOWA i FILIP 1999). Tworzeniu homooligomerów Bax przeciwstawia się np. antyapoptotyczne białko Bcl-xl, które w formie aktywnej hamuje proces łączenia się Bax w IV rzędowe struktury białkowe i tym samym tworzenie porów umożliwiających cytochromowi c opuszczenie mitochondrium. Jednak przy znacznym wzroście wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} zostaje również aktywowana fosfataza zależna od kalmoduliny – kalcyneuryna. Efektem tego procesu jest defosforylacja, a zarazem aktywacja proapoptotycznego białka Bad, którego funkcją jest wiązanie białka Bcl-xl i zniesienie jego hamującego wpływu na proces tworzenia homooligomerów Bax (Ryc. 1).

Kalcyneuryna defosforyluje również neuronalną izoformę syntazy tlenu azotu (ang. neuronal nitric oxide synthase, nNOS). Tlenek azotu (NO) produkowany przez nNOS jest inhibitorem łańcucha oddechowego oraz substratem dla rodnika nadutlenoazotynu ($\text{ONOO}\cdot$), który powstaje w reakcji NO z anionorodnikami podnatlenkowymi ($\text{NO} + \text{O}_2^-$). Warto wspomnieć, iż właściwości neuroprotektoryjne przypisuje się śródbłonkowej izoformie syntazy tlenu azotu (ang. endothelial NOS, eNOS). W wyniku jej działania powstający NO wykazuje właściwości naczy-

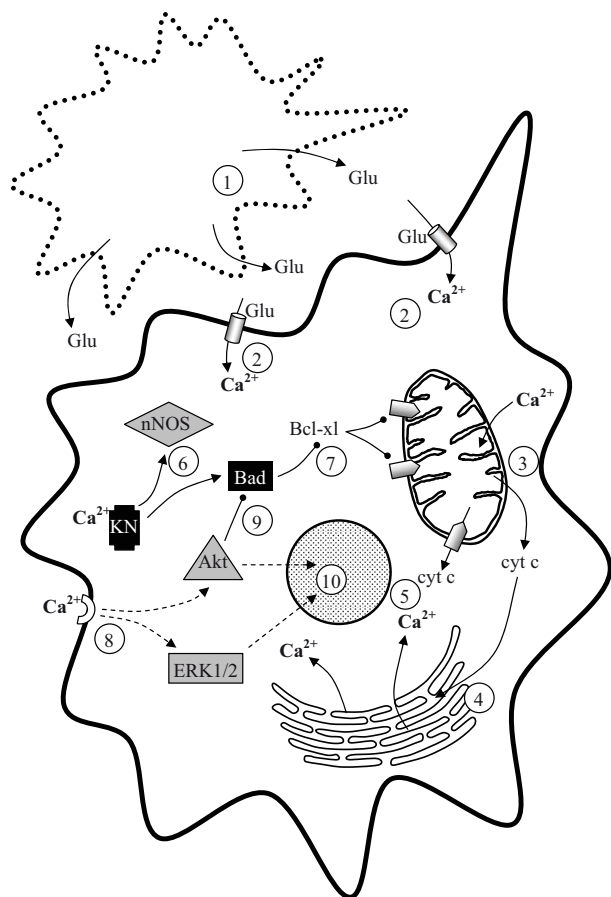
niorozszerzające oraz polepszające krążenie mózgowego w obrębie ogniska niedokrwienego (CASTILLO i RODRIGUEZ 2004). Inicjacja procesów apoptozy oraz aktywacja kalcineuryny, w których to procesach biorą udział

jony Ca^{2+} , są czynnikami doprowadzającymi do śmierci komórek mózgowych pomimo potencjalnie wystarczających zasobów energetycznych.

JONY WAPNIA JAKO INHIBITOR APOPTOZY ?

W 2006 r. w prestiżowym czasopiśmie naukowym „Neurology” ukazała się praca pokazująca, że stężenie wapnia w surowicy krwi ujemnie koreluje z obecnością deficytu neurologicznego u pacjentów z niedokrwienym udarem mózgu (OVBIAGELLE i współaut. 2006). W świetle przytoczonych proapoptycznych właściwości Ca^{2+} przedstawione wyniki mogą wydawać się kontrowersyjne (sam tytuł publikacji sformułowany był w formie pytającej). Jak można tłumaczyć korzystne działanie jonów wapnia na procesy zachodzące w obrębie neuronów? Dobrze znana rola jonów Ca^{2+} pełniących rolę wtórnego przekaźnika sygnału do wnętrza komórki została w ostatnich latach uzupełniona o dane pokazujące, iż wapń ma również właściwości przekaźnika pierwszego rzędu. Kaskada sygnałowa zainicjowana przez Ca^{2+} rozpoczyna

się od połączenia jonu z specyficznym receptorem (ang. calcium specific receptor, CaSR) zlokalizowanym w błonie komórkowej wielu typów komórek, w tym również neuronów. Połączenie CaSR ze swoim ligandem (głównie Ca^{2+} , ale też możliwe jest tutaj działanie Mg^{2+} , Gd^{3+} , niektórych aminokwasów oraz antybiotyków) powoduje aktywację pompy wapniowej usuwającej jony Ca^{2+} z komórki (zmniejszając ich stężenie w cytoplazmie), jak również pobudzenie wielu kaskadowo ułożonych szlaków enzymatycznych (BOUSHET i HENLEY 2005). Na szczególną zasługują dwa szlaki, które mogą mieć znaczenie w zapobieganiu kontrolowanej śmierci komórek. Pierwszy z nich rozpoczynany jest przez fosfolipazę C, w wyniku której powstający IP3 działa na kinazę zależną od IP3, która następnie fosforyluje (tym samym aktywuje) kinazę



Ryc. 1. Schematycznie przedstawione możliwe drogi działania pro- i antyapoptotycznego jonów Ca^{2+} .

Komórki, w których deficyt energetyczny doprowadza do spadku potencjału błonowego są źródłem kwasu glutaminowego (1). Kwas glutaminowy działając na receptory NMDA otwiera kanały jonowe. Efektem tego procesu jest napływ Ca^{2+} do cytoplazmy (2) oraz wypływ cytochromu c z mitochondrium (3). Cytochrom c łącząc się z receptorami dla IP3 na siateczce śródplazmatycznej (4) doprowadza do uwolnienia do cytoplazmy wewnątrzkomórkowych zasobów Ca^{2+} . Następstwem wzrostu stężenia Ca^{2+} jest wzrost stężenia cytochromu c w cytoplazmie (5). Aktywowana jonami Ca^{2+} kalcineuryna (KN) defosforyluje (oraz aktywuje) nNOS oraz białko Bad (6). Aktywne białko Bad wiąże antyapoptotyczne białko Bcl-xL (7), którego rolą jest hamowanie uwalniania cytochromu c z mitochondrium przez blokowanie tworzenia kanałów w błonie mitochondrialnej. Jony Ca^{2+} działając jako przekaźnik pierwszego rzędu aktywują szlak kinaz IP3/Akt oraz kinaz ERK1/2 (8). Kinaza Akt fosforyluje (inaktywuje) białko Bad (9) oraz podobnie jak kinazy ERK1/2 aktywuje ekspresję wielu białek antyapoptotycznych (10).

Akt. Oprócz szlaku kinaz IP3/Akt również aktywacja szlaku kinaz ERK1/2 może mieć znaczenie w zahamowaniu apoptozy, podobnie jak ma to miejsce w przypadku chorób nowotworowych, w których pobudzenie szlaku ERK1/2 ma właściwości antyapoptotyczne (STEPULAK i współaut. 2005). Aktywna kinaza Akt wykazuje zdolność fosforylowania (a tym samym inaktywacji) proapoptotycznego

białka Bad, które traci zdolności hamowania antyapoptotycznych białek Bcl-xl oraz Bcl-2. Końcowym efektem działania kinazy Akt jest zmniejszenie aktywności proapoptotycznych białek w komórce. Ponadto zarówno kinaza Akt, jak i kinazy ERK1/2 są enzymami zaangażowanymi w pobudzenie ekspresji wielu białek, również o właściwościach antyapoptotycznych (Ryc. 1).

MAGNEZ – NOWE I ROZWIANE NADZIEJE

Strategie terapeutyczne stosowane w udarze mózgu mają przed sobą dwa cele. Po pierwsze, stosowane preparaty przywracają krążenie w obrębie ogniska niedokrwienne (np. rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu, rtPA). Jednak bardzo wąskie okno terapeutyczne, w którym można zastosować takie leczenie (do 3 godzin od początku udaru) oraz inne specjalistyczne kryteria powodują, iż powyższą terapią objętych może być około 5% pacjentów z udarem niedokrwinnym (jedynie w wyspecjalizowanych Oddziałach Udarowych). Drugi rodzaj terapii jest ukierunkowany na neuroprotekcję, czyli maksymalną ochronę komórek nerwowych strefy półcienia, które oprócz deficytu energetycznego są narażone na zjawisko ekscytotoksyczności. Czy spośród kilkudziesięciu przetestowanych związków magnez może być uważany za substancję neuroprotektyną? Jony Mg^{2+} biorą udział w wielu fizjologicznych procesach, a ich niedobór może powodować stany nadmiernego przemęczenia i senności. W ośrodkowym układzie nerwowym około 80% jonów Mg^{2+} jest związana z ATP. Badania przy użyciu spektroskopii rezonansu magnetycznego pokazują, iż w ognisku niedokrwinnym stężenie wolnego Mg^{2+} jest zwiększone, prawdopodobnie jako efekt uwalniania Mg^{2+} z połączeń z ATP, którego ilość drastycznie maleje (MUIR 2000). W badaniach eksperymentalnych zarówno na zwierzętach, jak i *in vitro* magnez wykazywał bardzo wyraźne właściwości neuroprotektynne. Już w stężeniu fizjologicznym (1 mmol/l) hamuje uwalnianie glutaminianu z zakończeń synaptycznych oraz „wycisza” działanie receptorów NMDA odpowiedzialnych za zjawisko ekscytotoksyczności. U zwierząt, którym dootrzewnowo podawano siarczan magnezu (270 mg/kg masy ciała, co 4 godz.) po 24 godz. stwierdzono zmniejszenie wiązania glutaminianu z receptorem NMDA (około 50%) (HALLAK i współaut. 1994). Również badania

in vitro pokazały, iż jony Mg^{2+} zapobiegają spadkowi stężenia ATP w komórkach nerwowych hipokampa poddanych eksperymentalnym warunkom niedotlenienia. Wewnątrzkomórkowe jony Mg^{2+} mają właściwości buforujące jony Ca^{2+} , przez co łagodzą skutki wzrostu stężenia wapnia w cytoplazmie po otwarciu kanałów jonowych w błonie komórkowej oraz siateczce śródplazmatycznej. Magnez, podobnie jak wapń, ma powinowactwo do receptora CaSR, którego pobudzenie, jak wspomniano powyżej, uruchamia kaskadę szlaków enzymatycznych o właściwości antyapoptotycznych. Powyższe spostrzeżenia oraz wyniki z badań przeprowadzonych na zwierzęcych modelach udaru mózgu przyczyniły się do rozpoczęcia w latach 90. wieloosrodkowego badania klinicznego mającego na celu ustalenie czy i jak Mg^{2+} działa w udarze mózgu, pod kątem wykorzystania tego pierwiastka w celach terapeutycznych. Wynik badania opublikowany w 2004 r. niestety pokazał, że magnez jest bezpiecznym lekiem, jednak nie przynosi istotnych korzyści w leczeniu ostrej fazy udaru mózgu. Poprawę stanu klinicznego pacjentów zaobserwowano jedynie w przypadku tzw. udarów podkorowych (zatokowych), cechujących się obecnością niewielkich, najczęściej rozsianych ognisk niedokrwiniennych w obrębie głębokich struktur mózgowia (istoty białej, jąder podkorowych) (MUIR i współaut. 2004). Brak spektakularnej poprawy stanu klinicznego w przypadku pacjentów z udarem mózgu, którzy mieli rozpoczętą terapię $MgSO_4$ w ciągu pierwszych 12 godzin choroby, można częściowo tłumaczyć dość długim czasem od zaistnienia niedokrwienia do momentu wdrożenia leczenia. Nasuwa się pytanie, czy wysokie stężenie Mg^{2+} w momencie pojawienia się objawów choroby korzystnie wpływa na stan neurologiczny pacjentów? Dotychczasowe badania nie wskazują na istnienie takiej zależności (OVBIAGELE i współaut. 2006).

PODSUMOWANIE

Śmierć komórek strefy półcienia ogniska niedokrwiennego jest spowodowana głównie zjawiskiem ekscytotoksyczności, czyli nadmiernym pobudzeniem układu glutaminergicznego. Rola jonów Ca^{2+} , jako wtórnego przekaźnika inicjującego kaskadę zdarzeń molekularnych doprowadzających do śmierci neuronów strefy półcienia, jest dobrze poznana. Odkrycie specyficznego receptora, zlokalizowanego na błonach komórkowych, wykazującego wysokie powinowactwo do jonów Ca^{2+} pozwala zaliczyć ten pierwiastek również do przekaźników pierwszego rzędu. Pobudzenie receptora CaSR przez zewnątrzkomórkowe jony Ca^{2+} wydaje się wywierać

efekt antyapoptotyczny w przeciwieństwie do proapoptotycznego działania wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} . O ile wapń w zależności od lokalizacji (wewnątrz lub zewnątrzkomórkowy) może wykazywać działanie przeciwstawne, o tyle jony Mg^{2+} , zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowe, mają właściwości antyapoptotyczne. Niestety obecnie brak jest ewidentnych dowodów na skuteczność leczenia udaru mózgu za pomocą magnezu. Jednakże dokładne poznanie mechanizmów działania zarówno Mg^{2+} , jak i Ca^{2+} w strefie penumbry może przyczynić się do opracowania preparatów łączących pozytywne cechy obu omawianych pierwiastków.

THE MISTERY OF STROKE: THE ROLE OF CALCIUM AND MAGNESIUM IN THE PENUMBRA NEURONS' DEATH

Summary

Penumbra zone is localized on the border of ischaemic focus. Low cerebral blood flow allows the neurons to survive but it is insufficient for normal processes. Calcium ions play a significant role in the development of apoptosis within the neurons in penumbra. Intracellular calcium "switches on" releasing cytochrom c from mitochondria – which is an important component of apoptosis. Extracellular calcium binds to the specific receptor localized on the cell membrane and activates antiapoptotic pathway which helps the cell to survive. Magnesium, in contrast to cal-

cium ions, also exerts an antiapoptotic effect in the intracellular localization. Inhibition of glutamate (amino acid which takes part in excitotoxicity) had brought the hope that magnesium could have been used in the stroke treatment. Unfortunately huge clinical trial with magnesium early administration in the acute ischemic stroke did not show the significant benefits of magnesium treatment. Future studies should be focused on recognition of molecular mechanism of magnesium and calcium ions acting in the excitotoxicity and apoptosis of the penumbra neurons.

LITERATURA

- BOUSCHET T., HENLEY J. M., 2005. *Calcium as an extracellular signaling molecule: perspectives on the Calcium Sensing Receptor in the brain*. C. R. Biol. 328, 691–700.
- CASTILLO J., RODRIGUEZ I., 2004. *Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischaemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice*. Cerebrovasc. Dis. 17(Suppl 1), 7–18.
- HALLAK M., BERMAN R. F., IRTENKAUF S. M., JANUSZ C. A., COTTON D. B., 1994. *Magnesium sulfate treatment decreases N-methyl-D-aspartate receptor binding in the rat brain: An autoradiographic study*. J. Soc. Gynecol. Invest. 1, 25–30.
- MARZO I., BRENNER C., ZAMZAMI N., SUSIN S. A., BEUTNER G., BRDICZKA D., REMY R., XIE Z., REED J. C., KROEMER G., 1998. *The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by Caspases and Bcl-2-related Proteins*. J. Exp. Med. 187, 1261–1271.
- MATSON M. P., CHAN S. L., 2003. *Calcium orchestrates apoptosis*. Nat. Cell. Biol. 5, 1041–1043.
- MUIR K. W., 2000. *Therapeutic potential of Magnesium in the Treatment of Acute Stroke*. J. Stroke Cerebrovasc. Dis. 9, 257–267.
- MUIR K. W., LEES K. R., FORD I., DAVIS S. i współaut., 2004. *Magnesium for acute stroke (Intravenous magnesium efficacy in stroke trial): randomized control trial*. Lancet 363, 439–445.
- OVBIAGELE B., LIEBESKIND D. S., STARKMAN S., SANOSIAN N., KIM D., RAZINA T., SAVER J. L., 2006. *Are elevated admission calcium levels associated with better outcomes after ischemic stroke?* Neurology 67, 170–173.
- ROŻYNKOWA D., FILIP A., 1999. *Endogenne białka przeciwdziałające apoptozie*. Postępy Biol. Kom. 26, 561–578.
- RUPNIEWSKA Z., BOJARSKA-JUNAK A., 2004. *Apoptoza: Przepuszczalność błony mitochondrialnej i rola pełniona przez białka z rodziny Bcl-2*. Postępy Hig. Med. Dośw. 58, 538–547.
- STEPULAK A., SIFRINGER M., RZESKI W., ENDESFELDER S., GRATOPP A., ELENA E. POHL E. E., BITTIGAU P., FELDERHOFF-MUESER U., KAINDL A. M., BUHRER C., HANSEN H. H., STRYJECKA-ZIMMER M., TURSKI L., IKONOMIDOU C., 2005. *NMDA antagonist inhibits the extracellular signal-regulated kinase pathway and suppresses cancer growth*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 102, 15605–15610.
- WARLOW C., SUDLOW C., DENNIS M., WARDLAW J., SANDERCOCK P., 2003. *Stroke*. Lancet 362, 1211–1224.